

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. November 2004 (18.11.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/099398 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 9/02,  
C12Q 1/26

Lörrach (DE). BACHMANN, Tili, T. [DE/DE]; Hessen-  
lauweg 19, 70569 Stuttgart (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/004748

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGE-  
SELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
5. Mai 2004 (05.05.2004)

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 21 082.2 9. Mai 2003 (09.05.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];  
67056 Ludwigshafen (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAUER, Bernhard  
[DE/DE]; Merowingerstrasse 1, 67136 Fussgönheim (DE).  
HABICHER, Tilo [DE/DE]; Wormser Strasse 7, 67346  
Speyer (DE). SCHMID, Rolf [DE/DE]; In den Riedwiesen  
3, 70329 Stuttgart (DE). MAURER, Steffen, Christian  
[DE/DE]; Bergstrasse 30, 73525 Schwäbisch Gmünd  
(DE). URLACHER, Vlada, Beniaminovna [UZ/DE];  
Walcker Strasse 18, 70374 Stuttgart (DE). SCHULZE,  
Holger [DE/DE]; Schorndorfer Str. 3, 73614 Schorndorf  
(DE). HUBER, Norbert [DE/DE]; Körnerstr. 1A, 79539

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

54508

020912

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING A HYDROXYLATION CATALYST AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES HYDROXYLIERUNGSKATALYSATORS UND SEINE VER-  
WENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing a hydroxylation catalyst by: i) incorporating a cytochrome P450  
monooxygenase in a sol-gel matrix; ii) incorporating an enzymatic NADPH regeneration system in a sol-gel matrix, and; combining  
both constituents i) and ii) provided that they had not already been mixed together before incorporation.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung eines Hydroxylierungskatalysators indem man i) eine Cytochrom P450 Monoo-  
xygenase in einer Sol-Gel Matrix einbettet, ii) ein enzymatisches NADPH-Regenerationssystem in einer Sol-Gel Matrix einbettet,  
und beide Komponenten i) und ii) zusammenfügt, sofern sie nicht schon vor der Einbettung zusammengemischt waren.

WO 2004/099398 A1

DP

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Verfahren zur Herstellung eines Hydroxylierungskatalysators und seine Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Hydroxylierungskatalysators auf Basis einer Cytochrom P450 Monooxygenase, sowie Verfahren zur Hydroxylierung organischer Substrate mittels dieser Hydroxylierungskatalysatoren.

Cytochrom P450 Monooxygenasen (im folgenden CYP genannt) katalysieren die Hydroxylierung einer Reihe hydrophober Substrate an aktivierten und nicht-aktivierten Kohlenstoffatomen. Dabei wird ein Sauerstoffatom von O<sub>2</sub> in das Substrat eingebaut, während das andere Sauerstoffatom zu H<sub>2</sub>O reduziert wird unter gleichzeitiger Oxidation von Nicotin-Adenin-Dinukleotid (Phosphat) (NAD(P)H). Diese Hydroxylierung geschieht in vielen Fällen regio- und stereospezifisch.

Eine besonders vielversprechende Cytochrom P450 Monooxygenase ist das ursprünglich aus *Bacillus megaterium* klonierte Gen, im folgenden CYP BM-3 genannt. Es handelt sich dabei um ein 119 kDa großes natürliches Fusionsprotein, das aus einer Häm-enthaltenden Monooxygenase-Domäne und einer FAD- und FMN-enthaltenden Reduktase-Domäne zusammengesetzt ist (L.P.Wen, A.J. Fulco, J. Biol. Chem. 1987, 262, 6676-6682; A.J.Fulco, R.T.Ruettinger, Life Sci. 1987, 40, 1769-1775).

Die natürlichen Substrate für CYP BM-3 sind langkettige Fettsäuren (C12-C20), die ausschliesslich an den subterminalen Positionen  $\omega$ -1,  $\omega$ -2,  $\omega$ -3, teilweise mit hoher Enantioselektivität hydroxyliert werden. Varianten des CYP BM-3 (sogenannte Muteine) zeigen auch eine Aktivität gegenüber nicht-natürlichen Substraten wie kurzkettige Fettsäuren (Ost et al. FEBS Lett. 2000, 486, 173-177; Li et al. Biochim. Biophys. Acta 2001, 1545, 114-121), Indolen (Li et al. Chemistry 2000, 6, 1531-1536), polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (Li et al. Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67, 5735-5739), Alkanen (Appel et al. J. Biotechnol. 2001, 88, 167-171) und Styrolen (Li et al. FEBS Lett. 2001, 508, 249-252).

Einer Anwendung dieser CYP im größeren technischen Maßstab stehen immer noch die Probleme der geringen Stabilität und der Produktabtrennung entgegen. Ein weiterer Nachteil ist die Abhängigkeit der CYP von teuren Cofaktoren wie NADPH.

Diese Probleme lassen sich teilweise dadurch lösen, daß die CYP immobilisiert für die Hydroxylierungsreaktionen eingesetzt werden. Allerdings wird durch viele Immobilisierungsverfahren das Enzym zumindest teilweise inaktiviert oder es besteht diffusionskontrolliert eine limitierte Versorgung des Enzyms mit benötigten Cofaktoren und Substrat.

Es bestand daher die Aufgabe, ein Verfahren bereitzustellen, daß es erlaubt CYP mit hoher enzymatischer Aktivität zu immobilisieren.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Hydroxylierungskatalysators indem man

- 5           i)       eine Cytochrom P450 Monooxygenase in einer Sol-Gel Matrix einbettet,  
          ii)       ein enzymatisches NADPH-Regenerationssystem in einer Sol-Gel Matrix einbettet,  
          und beide Komponenten i) und ii) zusammenfügt, sofern sie nicht schon vor der Einbettung zusammengemischt waren.

10

Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) und ihr Einsatz bei Biotransformationen sind dem Fachmann beispielsweise aus E.T. Farinas et al. Adv. Synth. Catal. 2001, 343, 601-606 oder V. Urlacher and R.D. Schmid Curr. Opin. Biotechnol. 2002, 13, 557-564  
15       bekannt.

Insbesondere sind solche CYP für das erfindungsgemäße Verfahren gut geeignet, die ursprünglich aus Mikroorganismen, insbesondere solchen der Gattung Bacillus isoliert worden sind.

20

Eine besonders gut geeignete Cytochrom P450 Monooxygenase ist das ursprünglich aus Bacillus megaterium klonierte Protein, im folgenden CYP BM-3 genannt. Es handelt sich dabei um ein 119 kDa großes natürliches Fusionsprotein, das aus einer Häm-enthaltenden Monooxygenase-Domäne und einer FAD- und FMN-enthaltenden Reduktase-Domäne zusammengesetzt ist (L.P.Wen, A.J. Fulco, J. Biol. Chem. 1987, 262, 6676-6682; A.J.Fulco, R.T.Ruettinger, Life Sci. 1987, 40, 1769-1775).

25

Ausgehend von diesem CYP-BM-3 können Muteine durch rekombinante DNA Techniken produziert werden, die an bestimmten Aminosäurepositionen Veränderungen gegenüber dem wildtyp CYP BM-3 tragen.

30

Besonders für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Muteine sind solche, die an der Position 74 eine andere Aminosäure als Ala tragen, und/oder an der Position 87 eine andere Aminosäure als Phe tragen und/oder an der Position 188 eine andere  
35       Aminosäure als Leu tragen und/oder an der Position 386 eine andere Aminosäure als Phe tragen. Die Veränderungen an den aufgeführten Positionen können entweder als Einzelmutationen oder auch kumuliert als Mehrfachmutationen eingeführt werden.

Ein solches, wegen seiner großen Substratbreite besonders gut geeignetes Mutein ist  
40       dasjenige, das gegenüber der wildtyp CYP BM-3 die folgenden drei Aminosäuresubstitu-

tionen besitzt: Position 74 Ala ersetzt durch Gly, Position 87 Phe ersetzt durch Val, Pos 188 Leu ersetzt durch Gln. Dieses Mutein kann insbesondere für die Hydroxilierung von Alkanen und Aromaten eingesetzt werden.

- 5 Ein weiteres besonders für die Hydroxilierung von  $\beta$ -Ionon geeignetes Mutein ist dasjenige, das gegenüber der Wildtyp CYP BM-3 die folgenden drei Aminosäuresubstitutionen besitzt: Position 74 Ala ersetzt durch Glu, Position 87 Phe ersetzt durch Val, Pos 386 Phe ersetzt durch Ser.

10

Die Einbettung von Enzymen in Sol-Gel Matrices ist in einem Übersichtsartikel von I. Gill, Chem. Mater. 2001, 13, 3404-3421 beschrieben.

15

Besonders geeignete Sol-Gel Matrices für das erfindungsgemäße Verfahren sind solche auf Kieselsäure Basis. Besonders geeignete Sol-Gel Matrices können aus Alkoxysilanen, insbesondere aus Tetraalkoxysilanen vor allem Tetraethoxysilane (TEOS) und Tetramethoxysilane (TMOS) hergestellt werden. Zur Herstellung der Sol-Gel-Matrices und der Einbettung von CYP wird auf den o.g. Artikel von Gill verwiesen (I. Gill, Chem. Mater. 2001, 13, 3404-3421) auf den hiermit in vollem Umfang Bezug genommen wird.

20

Das enzymatische NADPH-Regenerationssystem (im folgenden NADPH-RS genannt) besteht aus einem  $\text{NAD}^+$  bzw.  $\text{NADP}^+$  abhängigen Enzym, das ein Substrat zu einem Produkt oxidiert unter gleichzeitiger Reduktion des  $\text{NAD}^+$  zu NADH bzw. des  $\text{NADP}^+$  zu NADPH. Geeignet sind dafür prinzipiell alle  $\text{NAD}^+$  bzw.  $\text{NADP}^+$  abhängigen Dehydrogenasen, insbesondere mikrobielle Dehydrogenasen und insbesondere Formiatdehydrogenasen.

25

- Eine bevorzugte Ausführungsform des NADPH-RS ist die  $\text{NADP}^+$  abhängige Formiatdehydrogenase (EC 1.2.1.2) im folgenden mit FDH abgekürzt aus *Pseudomonas* sp. 101. FDH katalysiert die  $\text{NAD}^+$  abhängige Oxidation von Formiat zu  $\text{CO}_2$ . Die Vorteile dieses Systems liegen bei den geringen Substratkosten (Formiat) und der leichten Entfernung des entstehenden Produkts ( $\text{CO}_2$ ). Eine mutierte Form der FDH weist eine hohe Aktivität mit  $\text{NADP}^+$  auf und kann daher besonders gut als NADPH regenerierendes Enzym in Kombination mit CYP eingesetzt werden. Diese besonders gut geeignete mutierte Form der FDH ist von Tishkov et al. Biotechnol. Bioeng. 1999, 64, 187-193 sowie von Seelbach et al. Tetrahedron Lett. 1996, 37, 1377-1380 beschrieben. In diesen genannten Dokumenten ist sowohl die natürliche als auch die mutierte FDH beschrieben, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung, insbesondere ihrer rekombinanten Expression in *E. coli*.

30

35

40

Die Einbettung von CYP und NADPH-RS in eine Sol-Gel Matrix kann gleichzeitig oder in getrennten Ansätzen erfolgen. Unter gleichzeitiger Einbettung versteht man, daß zuerst eine Zubereitung von CYP, bevorzugt eine Lösung von CYP, mit einer Zubereitung von NADPH-RS, bevorzugt einer Lösung von NADPH-RS, vereinigt wird und diese vereinigte Zubereitung anschließend in die Sol-Gel Matrix eingebettet wird.

Unter einer getrennten Einbettung ist zu verstehen, daß eine Zubereitung von CYP, bevorzugt eine Lösung von CYP, in eine Sol-Gel Matrix eingebettet wird und in einem zweiten Ansatz eine Zubereitung von NADPH-RS, bevorzugt einer Lösung von NADPH-RS, in eine Sol-Gel Matrix eingebettet wird und anschließend diese beiden Ansätze vereinigt werden.

Bevorzugt verwendet wird für das erfindungsgemäße Verfahren die getrennte Einbettung, da bei ihr auch das stöchiometrische Verhältnis von CYP zu NADPH-RS noch im Nachhinein flexibel einstellbar ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Zubereitungen, die eine CYP und ein NADPH-RS eingebettet in einer Sol-Gel Matrix enthalten. Solche Zubereitungen sind nach den oben beschriebenen Verfahren herstellbar. Diese Zubereitungen haben den Vorteil, daß es damit gelingt, Hydroxylierungskatalysatoren in stabiler, gut lagerfähiger Form herzustellen und für den Einsatz bei spezifischen Hydroxylierungsreaktionen bereitzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur enzymatischen Hydroxylierung eines Substrates unter Verwendung eines der erfindungsgemäß herstellbaren Hydroxylierungskatalysatoren. Als Substrat geeignet sind eine Vielzahl von organischen Verbindungsklassen, insbesondere langkettige Fettsäuren (C12-C20), die insbesondere an den subterminalen Positionen  $\omega$ -1,  $\omega$ -2,  $\omega$ -3 hydroxiliert werden, aber auch kurzkettige Fettsäuren (Ost et al. FEBS Lett. 2000, 486, 173-177 ; Li et al. Biochim. Biophys. Acta 2001, 1545, 114 - 121), Indole (Li et al. Chemistry 2000, 6, 1531-1536), polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Li et al. Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67, 5735-5739), Alkane (Appel et al. J. Biotechnol. 2001, 88, 167-171) und Styrole ( Li et al. FEBS Lett. 2001, 508, 249-252).

Die Umsetzung dieser Substrate mit dem erfindungsgemäß hergestellten Hydroxylierungskatalysator erfolgt unter dem Fachmann für enzymatische Reaktionen bekannten Bedingungen. Die Reaktion kann in einem breiten Temperaturbereich zwischen 0 und 70, bevorzugt zwischen 5 und 50 und besonders bevorzugt zwischen 10 und 40°C durchgeführt werden.

Das zu hydroxylierende Substrat kann in einem organischen oder wäßrigen Lösungsmittel gelöst oder suspendiert vorliegen, bei flüssigen Substraten kann unter Umständen auch ganz auf die Zugabe von Lösungsmitteln verzichtet werden. Bevorzugt für die Umsetzung ist ein Gemisch aus wäßrigen und organischen Lösungsmitteln, insbesondere DMSO/Wasser. Besonders geeignet sind solche DMSO/Wasser Gemische bei denen DMSO 1-10% v/v beträgt.

Die Hydroxylierungsreaktion kann batchweise oder kontinuierlich durchgeführt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform mit FDH als NADPH-RS wird die Reaktion kontinuierlich durchgeführt, wobei neben dem zu hydroxylierenden Substrat kontinuierlich auch Formationen der Reaktion zugeführt werden und das hydroxylierte Produkt sowie das entstehende CO<sub>2</sub> kontinuierlich der Reaktion entnommen werden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht.

#### Aktivität und Stabilität der Sol-Gel immobilisierten CYP BM-3

Als Modellreaktion wurde die Hydroxylierung von p-Nitrophenoxydecan säure (10-pNCA) benutzt, die einen leichten photometrischen Nachweis des gebildeten Produkts p-Nitrophenolat erlaubt (Schwaneberg et al. Anal. Biochem. 1999, 269, 359-366).

Nach Zugabe zur Reaktionsmischung bildet das immobilisierte Enzym eine trübe Mischung. Daher waren direkte kinetische Versuche zur Aktivitätsbestimmung des Sol-Gel-eingebetteten CYP BM-3 nicht möglich. Daher wurde die Aktivität des Sol-Gel-eingebetteten CYP BM-3 durch Inkubation aller Komponenten des Standard pNCA Tests für eine bestimmte Zeitspanne bestimmt und anschliessendes Zentrifugieren um das gelbe Reaktionsprodukt vom festen Katalysator abzutrennen, bestimmt. Aus dem Überstand wurde dann die Absorption bei 410 nm bestimmt.

Untersuchungen zur Langzeitstabilität ergaben, daß die im Sol-Gel eingebettete CYP BM-3 bei 4°C während 36 Tage keinen Aktivitätsverlust erlitt. Das freie Enzym wies eine Halbwertszeit von 26 Tagen auf bei Lagerung in 50 mM KPi und eine Halbwertszeit von 288 Tagen bei Stabilisierung mit 50% Glycerol. Die Halbwertszeit des Sol-Gel eingebetteten Enzyms ist beträchtlich länger als diese 288 Tage.

Das erfindungsgemäß immobilisierte Enzym weist auch bei 25°C eine bemerkenswert hohe Stabilität auf. Bei dieser Temperatur wird die Halbwertszeit auf 29 Tage bestimmt.

Eine weitere selektive Hydroxilierungsreaktion wurde mit dem Sol-Gel-eingebetteten CYP BM-3 am Substrat n-Octan durchgeführt. Es wurden 79% des Eduktes hydroxiliert. Erhalten wurden die Regioisomeren 2-Oktanol, 3-Oktanol und 4-Oktanol in einem molaren Verhältnis von 1:2,1:1,6 (Gaschromatografisch nachgewiesen).

5

Eine weitere selektive Hydroxilierungsreaktion wurde mit dem Sol-Gel-eingebetteten CYP BM-3 am Substrat Naphtalin durchgeführt. Es wurden 77% des Eduktes hydroxiliert. Als Hauptprodukt wurde 1-Naphtol (85%) und als Nebenprodukt 2-Naphtol (15%) erhalten (Gaschromatografisch nachgewiesen).

10

#### Cofaktor Regeneration

Zwei Möglichkeiten der erfindungsgemäßen Cofaktor-Regenerierung wurden untersucht. In einer ersten Reihe von Experimenten wurde die Co-immobilisierung von beiden Enzymen (CYP und FDH) untersucht, in einer zweiten Reihe von Experimenten wurden beide Enzyme separat immobilisiert und anschliessend im Verhältnis 1:1 (m/m) zusammengemischt. Die Einbettung erfolgte in beiden Fällen in eine TEOS Sol-Gel Matrix.

15

Co-immobilisierte Enzyme aus der ersten experimentellen Reihe wurden in die p-NCA-Test gegeben mit einem zehnfachen Überschuß von p-NCA über oxidiertes NADP<sup>+</sup>. Die Aktivität der separat immobilisierten FDH in Kombination mit separat immobilisierte CYP war beträchtlich höher als bei den co-immobilisierten Enzymen.

20

Nach drei Stunden Reaktionszeit zeigten die co-immobilisierten Enzyme einen Umsatz von bis zu 28% der pNCA Umsetzung, während die Mischung aus separat immobilisierten Enzymen zu einer Umsetzung von bis zu 75% führte.

25

Diese Ergebnisse machen es möglich, einen kontinuierlich arbeitenden Bioreaktor auf Basis eines Sol-Gel eingebetteten CYP mit NADPH-RS zu betreiben.

30



## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Hydroxylierungskatalysators indem man
  - i) eine Cytochrom P450 Monooxygenase in einer Sol-Gel Matrix einbettet,
  - ii) ein enzymatisches NADPH-Regenerationssystem in einer Sol-Gel Matrix einbettet,und beide Komponenten i) und ii) zusammenfügt, sofern sie nicht schon vor der Einbettung zusammengemischt waren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Monooxygenasen Enzyme, die ursprünglich aus der Gattung Bacillus isoliert worden sind, verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Monooxygenasen aus Bacillus megaterium isoliert worden sind.
4. Zubereitungen enthaltend eine Cytochrom P450 Monooxygenase und ein enzymatisches NADPH-Regenerationssystem in einer Sol-Gel Matrix.
5. Verfahren zur enzymatischen Hydroxylierung eines Substrates, indem man das Substrat mit einem Hydroxylierungskatalysator, herstellbar gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 umsetzt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Substrat  $\beta$ -Ionon eingesetzt wird.

**mis Page Blank (uspto)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/004748

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N9/02 C12Q1/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, PASCAL, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data, PAJ, FSTA

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IWUOHA, EMMANUEL I. ET AL: "Reactivities of organic phase biosensors 3: electrochemical study of cytochrome P450cam immobilized in a methyltriethoxysilane sol-gel" ELECTROANALYSIS, 12(12), 980-986 CODEN: ELANEU; ISSN: 1040-0397, 2000, XP009034944 the whole document	1-6
X	GILL IQBAL ECKERT HELLMUT (AV.-PROP.) ET AL: CHEMISTRY OF MATERIALS, 13(10), 3404-3421, 261 REFS. ISSN: 0897-4756, 2001, XP002291608 das ganze Dokument, insbesondere Tabelle 3	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the International filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 August 2004

Date of mailing of the international search report

26/08/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bassias, I

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/004748

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MAURER S C ET AL.: "Immobilisation of P450 BM-3 and an NADP+ Cofactor Recycling System: Towards a Technical Application of Heme-Containing Monooxygenases in Fine Chemical Synthesis" ADVANCED SYNTHESIS AND CATALYSIS, vol. 345, no. 6-7, June 2003 (2003-06), pages 802-810, XP002291609 the whole document -----	1-6
P,X	URLACHER V B ET AL: "Microbial P450 enzymes in biotechnology" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 64, no. 3, April 2004 (2004-04), pages 317-325, XP002291610 ISSN: 0175-7598 das ganze Dokument, insbesondere S. 320, Paragraph "Immobilization" und Fig. 4 -----	1-6
A	MILES A C S ET AL: "Protein engineering of cytochromes P-450" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. PROTEIN STRUCTURE AND MOLECULAR ENZYMOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM,, NL, vol. 1543, no. 2, 29 December 2000 (2000-12-29), pages 383-407, XP004279114 ISSN: 0167-4838 -----	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/004748

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N9/02 C12Q1/26

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, PASCAL, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data, PAJ, FSTA

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	IWUOHA, EMMANUEL I. ET AL: "Reactivities of organic phase biosensors 3: electrochemical study of cytochrome P450cam immobilized in a methyltriethoxysilane sol-gel" ELECTROANALYSIS, 12(12), 980-986 CODEN: ELANEU; ISSN: 1040-0397, 2000, XP009034944 das ganze Dokument	1-6
X	GILL IQBAL ECKERT HELLMUT (AV.-PROP.) ET AL: CHEMISTRY OF MATERIALS, 13(10), 3404-3421, 261 REFS. ISSN: 0897-4756, 2001, XP002291608 das ganze Dokument, insbesondere Tabelle 3	1-6

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☐ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. August 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26/08/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bassias, I

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/004748

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>MAURER S C ET AL.: "Immobilisation of P450 BM-3 and an NADP+ Cofactor Recycling System: Towards a Technical Application of Heme-Containing Monooxygenases in Fine Chemical Synthesis"</p> <p>ADVANCED SYNTHESIS AND CATALYSIS, Bd. 345, Nr. 6-7, Juni 2003 (2003-06), Seiten 802-810, XP002291609</p> <p>das ganze Dokument</p>	1-6
P,X	<p>URLACHER V B ET AL: "Microbial P450 enzymes in biotechnology"</p> <p>APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 64, Nr. 3, April 2004 (2004-04), Seiten 317-325, XP002291610</p> <p>ISSN: 0175-7598</p> <p>das ganze Dokument, insbesondere S. 320, Paragraph "Immobilization" und Fig. 4</p>	1-6
A	<p>MILES A C S ET AL: "Protein engineering of cytochromes P-450"</p> <p>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. PROTEIN STRUCTURE AND MOLECULAR ENZYMOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM,, NL, Bd. 1543, Nr. 2, 29. Dezember 2000 (2000-12-29), Seiten 383-407, XP004279114</p> <p>ISSN: 0167-4838</p>	